

Problemática de nuevas plagas y enfermedades

## Enfermedades virales y vectores emergentes. Avances en la detección fiable de virus, viroides y fitoplasmas de especies leñosas

Mariano Cambra Álvarez (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Laboratorio de Virología e Inmunología. Moncada (Valencia). E-mail: mcambra@ivia.es).

### INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por virus, viroides y fitoplasmas en vegetales son de difícil control e incurables al no poseer las plantas un sistema de protección tan eficaz como el inmunitario de animales. Además, estos agentes patógenos son insensibles in planta a tratamientos químicos (virus y viroides) o son muy poco eficaces o no están autorizados tratamientos antibióticos sistémicos (fitoplasmas). Todos los grupos de agentes fitopatógenos mencionados son fácilmente transmisibles ya sea por multiplicación vegetativa (injerto, estaquillado o acodo) o sexual (semilla), e incluso por vectores, polen, mecánicamente (poda, recolección, labores culturales...) o por simple contacto. Todo ello implica que sean frecuentes las infecciones y estas sucedan con relativa facilidad, especialmente en cultivos leñosos (frutales, cítricos, vid, olivo u otros) que permanecen muchos años localizados (e inmóviles) en el mismo espacio a pleno campo.

La agricultura moderna se basa, en muchas ocasiones, en el cultivo de numerosos individuos genéticamente idénticos. La resistencia de estas grandes poblaciones homogéneas es susceptible de ser superada por patógenos muy diversos que además, pueden actuar sinérgicamente. En un mundo cada vez más globalizado donde los intercambios comerciales priman sobre la sanidad vegetal, es frecuente la aparición de nuevos patógenos y vectores, que causan enfermedades emergentes. La producción de material vegetal, semillas y plantas de vivero se realiza, cada vez con más intensidad, en países exóticos en los que nuevos patógenos para los cultivos tradicionales emergen de zonas con vegetación espontánea o reservorios en los que se multiplicaban en especies tolerantes, o causando enfermedades en plantas sin interés comercial. Además, cada vez es más clara la disponibilidad limitada de tierras cultivables, el cambio climático y la inestabilidad estacional del clima y todo ello unido al comercio global y al frecuente tráfico de material vegetal, implica que las enfermedades virales de las plantas supongan una amenaza cada vez más seria. En estas condiciones se favorece la emergencia de nuevas enfermedades e incluso la reemergencia de algunas ya erradicadas. Las enfermedades virales emergentes, en las que además, no se posee experiencia de su epidemiología ni de su control, suelen ser las que causan un mayor impacto económico en los cultivos leñosos.

La mayoría de las enfermedades emergentes de plantas son virales y su impacto en las plantaciones españolas y en las de otros países europeos y mediterráneos, puede ser grave. De hecho nuestra zona está bajo la amenaza constante de enfermedades virales emergentes o de la entrada, instauración y dispersión (introducción en general) de nuevas especies de artrópodos que pueden convertirse en eficaces vectores de patógenos virales o de fitoplasmas presentes, pero incapaces de dispersión al no existir sus vectores. España se sitúa en una zona de riesgo de introducción de patógenos y vectores no sólo por su situación geográfica y por sus condiciones climáticas muy diversas sino también



Figura 1. La presencia de *Toxoptera citricida* en el norte de España y Portugal, podría causar la dispersión de aislados agresivos del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) si se introduce en las zonas mediterráneas de cultivo de cítricos. Esta especie de pulgón emergente, es la más eficaz en transmitir cualquier aislado de CTV. También sus tratamientos de control podrían causar impacto ambiental por su obligado uso al constituir una importante plaga de los cítricos.

por la importancia económica, dinamismo y deseos de innovación del sector.

Hay básicamente tres escenarios y ejemplos en los que nuevos agentes patógenos y/o vectores de plantas leñosas coinciden con el resultado final de dispersión natural y enfermedad: **1)** el patógeno existente en una zona es dispersado por un nuevo vector emergente más eficaz que los previamente establecidos (ejemplo: aislados más agresivos que los habituales del virus de





**Figura 2. Los aislados tipo Marcus del virus de la sharka (PPV) (emergentes), muy agresivos en melocotonero, pueden ser dispersados eficazmente por diversas especies de pulgones presentes en las plantaciones de frutales de hueso en España** (Foto amablemente cedida por Dr. Miguel A. Cambra, Centro de Protección Vegetal, Diputación General de Aragón).

la tristeza de los cítricos y la introducción de la especie de pulgón *Toxoptera citricida* (Figura 1), **2**) los vectores presentes en una zona dispersan un agente patógeno emergente de reciente entrada y establecimiento (ejemplo: diferentes especies de pulgones comunes en los frutales de hueso dispersan aislados agresivos del virus de la sharka tipo Marcus o PPV-M)(Figura 2), y **3**) ambos, vectores y patógenos emergentes (Figura 3), se encuentran en una nueva zona (ejemplos: diversos nepovirus de árboles frutales y vid y nematodos vectores o fitoplasmas de la vid y especies de cicadélidos emergentes). Evidentemente sin uno de los componentes del binomio (patógeno y/o vector), no se produce una dispersión natural eficaz ni manifestación de enfermedad emergente.

El control de enfermedades de vegetales debe ser integrado para ser eficaz y se basa, entre otros, en el uso de plantas resistentes obtenidas por mejora convencional o mediante métodos biotecnológicos, y en el uso de material vegetal certificado sano (semillas y material propagado vegetativamente) cuando se instaure un cultivo. Ambas estrategias de control, requieren la disponibilidad de métodos de detección (aplicables a material vegetal y vectores sin síntomas) y diagnóstico (identificación del agente patógeno causante de síntomas determinados). Estos deben ser fiables, específicos, sensibles, rápidos y capaces de ser utilizados a gran escala de forma económica y rutinaria. Los métodos y protocolos de detección y diagnóstico tienen que incluir a agentes patógenos exóticos, que aunque no estén presentes en un país, pueden ser introducidos fortuita o intencionadamente.

Los métodos fiables de detección y diagnóstico de agentes patógenos en plantas o sus productos y en artrópodos constituyen la base de la prevención, cuarentena, erradicación y de la selección sanitaria y certificación (propagación exclusiva de plantas sanas como plantas madre de semillas, estaquillas o yemas). También, los métodos de detección y diagnóstico son esenciales en programas de saneamiento basados en termoterapia, cultivo de tejidos *in vitro* y/o producción de plantas resistentes a la infección mediante la inclusión de genes de resistencia.

Los diferentes métodos y sistemas de detección utilizados en patología vegetal son siempre directos ya que tratan de detectar (cuantitativamente o no), de forma específica, la presencia de un agente patógeno concreto o de alguna de sus dianas o metabolitos. Por tanto, los métodos de detección suelen ser



**Figura 3. Síntomas de "bois noir" asociados a la presencia de *Candidatus Phytoplasma solani* (grupo 16SrXII del stolbur). Ambos, patógeno y cicadélidos vectores pueden considerarse emergentes en España** (Foto amablemente cedida por Dr. Miguel A. Cambra, Centro de Protección Vegetal, Diputación General de Aragón).

sofisticados y frecuentemente presentan problemas. La producción de reactivos de diagnóstico de calidad no siempre es sencilla. Las técnicas y métodos han ido evolucionando para conseguir que el arte de la detección, diagnóstico y caracterización, sea cada vez más técnico y preciso.

## Detección y diagnóstico clásico, evolución y tendencias actuales

Hace apenas tres décadas las técnicas de diagnóstico rutinario de virus fitopatógenos y los métodos habituales de detección de los mismos en material vegetal y vectores estaban basados en pruebas de patogenidad o biológicas (inoculación de plantas indicadoras), microscopía electrónica, técnicas serológicas de aglutinación e inmunodifusión (principios de la técnica ELISA con anticuerpos policlonales de antiseros), electroforesis y técnicas de hibridación molecular.

La verdadera revolución en la detección de agentes fitopatógenos sucedió en 1977 con la puesta a punto del método ELISA. Su aplicación paulatina hizo posible la realización de análisis de forma sensible, rápida, sencilla, económica y en gran escala. Se estiman en más de 25 millones los análisis ELISA realizados en España en el campo de la fitopatología en los últimos 30 años.

El problema de la especificidad (fondos, frecuentes reacciones cruzadas o reacciones indeseadas) de muchos antiseros utilizados en ELISA, quedó resuelto con la posibilidad de producir anticuerpos monoclonales específicos. La tecnología de hibridomas, aplicada a patología vegetal en 1982, constituye sin duda, el segundo hito de importancia en el desarrollo de métodos y protocolos de diagnóstico. El tercer hito lo constituyó la disponibilidad y aplicación de técnicas de ingeniería genética y biología molecular en general, para producir reactivos de diagnóstico mediante el clonado y expresión de genes de interés. Finalmente la puesta a punto, en 1992, de la técnica de amplificación de ácidos nucleicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha vuelto a revolucionar la detección de agentes fitopatógenos, constituyendo en la actualidad el grupo de técnicas más sensibles y recomendables.

Las tendencias y objetivos en diagnóstico en la actualidad, vienen marcadas por: **1**) Tratar de mejorar las técnicas de preparación de muestras,



haciéndolas más simples y eficaces, **2)** Aumentar la especificidad de los reactivos, anticuerpos, sondas e iniciadores, **3)** Incrementar la sensibilidad de las técnicas de detección, **4)** Diseñar y aplicar métodos híbridos o integrados (biológico-serológico-moleculares), y **5)** Desarrollar métodos que permitan detecciones cuantitativas y de múltiples agentes patógenos en un único ensayo de forma simultánea o de protocolos que permitan agrupar numerosas muestras en una única prueba.

## Preparación de muestras, extractos, impresiones, escachados y otros avances

La preparación de extractos ha sido durante años la única posibilidad para extraer dianas de interés de material vegetal o de vectores. La preparación de extractos es generalmente costosa en tiempo y dinero y conlleva una serie de inconvenientes como la necesidad de utilizar tampones y equipos especiales, la liberación de inhibidores y la posible modificación de dianas. Además, implica riesgos de contaminación entre muestras cuando estas se procesan de forma rutinaria y en gran cantidad. En todo caso, la preparación de extractos limita seriamente el número de muestras que pueden analizarse diariamente, especialmente si el material vegetal es leñoso.

El uso de membranas para inmovilizar dianas mediante impresión o escachado de secciones de material vegetal o de vectores, es una interesante alternativa y un método directo de preparación de muestras sin los inconvenientes de la clásica preparación de extractos crudos. Las huellas, impresiones, improntas o escachados, pueden ser efectuadas en condiciones de campo, su realización es sencilla y económica y además, no requiere tampones ni equipos, ni operarios especializados.

Las actuales aplicaciones de dianas inmovilizadas en membranas o soportes sólidos incluyen la detección y caracterización de agentes fitopatógenos (de proteínas estructurales o no y de metabolitos) así como, de secuencias nucleotídicas y de la expresión de productos transgénicos. Para técnicas serológicas (Inmunoimpresión-ELISA o Tissue print-ELISA), se utilizan membranas de nitrocelulosa. Se emplean membranas de nylon cuando se revela la presencia de dianas impresas mediante hibridación molecular (Imprint Hybridisation) y membranas de papel o de nylon para aplicaciones de PCR (Print y Squash-PCR). Para algunos modelos bien estudiados, estos métodos son los más potentes y fiables. En otros casos, la impresión de dianas hace que se pierda sensibilidad y sean necesarios sistemas de PCR a tiempo real para una detección fiable. Este último método permite la detección de dianas de agentes patógenos en artrópodos individuales previamente capturados en trampas. Una ventaja adicional del sistema es que las membranas impresas pueden conservarse durante años sin pérdida de la posterior utilidad de las dianas y constituyen una alternativa para ser utilizadas como controles, sin riesgos, en el caso de enfermedades de cuarentena y para el intercambio entre laboratorios.

El desarrollo y adaptación de sistemas de extracción rápidos para uso en técnicas serológicas de flujo lateral o de pruebas en tiras que contienen fijados los reactivos, constituyen otro avance, a pesar de que la sensibilidad de estos sistemas sea mediana.

La clásica preparación de extractos también se ha simplificado con la disponibilidad de homogeneizadores de vástago, prensas, extractores de rodamientos y otros ingeniosos sistemas robotizados adaptados en laboratorios concretos para fines específicos. En general, los aparatos que preparan extractos son excelentes para su uso en técnicas serológicas ELISA, pero pueden suponer

contaminación entre muestras que deben evitarse en el caso de algunas técnicas moleculares de alta sensibilidad como las basadas en PCR. El uso de bolsas de plástico con malla fina o gruesa en su interior, permiten el uso de extractores de rodamientos o de simples martillos, que presionando a través del plástico, producen roturas celulares y extractos sin riesgo de contaminación. Las bolsas de plástico son una excelente alternativa a otros métodos, ya que pueden usarse en campo en el momento de la toma de muestras y una vez realizados los extractos, pueden conservarse congelados en la misma bolsa.

## Avances en el incremento de la especificidad

La mediana especificidad de los anticuerpos policlonales producidos al inmunizar animales con soluciones purificadas, ha podido ser mejorada con el uso de antígenos recombinantes. No obstante, en los antiseros únicamente el 10% de las inmunoglobulinas generadas, pueden considerarse específicas del antígeno inmunizante. Este hecho es independiente de la calidad original del antígeno empleado en la inmunización. La especificidad de los anticuerpos se ha resuelto mediante la tecnología de hibridomas (anticuerpos monoclonales) y mediante la posibilidad de clonar y expresar genes de anticuerpos en fagos, bacterias, levaduras, plantas y animales (anticuerpos recombinantes). Las estrategias de generación de anticuerpos recombinantes específicos son diversas y pueden partir de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales o de genotecas inmunes (de ratones inmunizados), nativas o semisintéticas. Los fragmentos de anticuerpos generados por ingeniería genética pueden llevar de forma constitutiva versiones mejoradas, más activas, de fosfatasa alcalina de mucosa intestinal de ternera u otras enzimas marcadoras y por tanto, pueden constituir excelentes "*conjugados recombinantes*". Se pueden realizar versiones apropiadas de los anticuerpos recombinantes para tapizar o sensibilizar placas ELISA y para ser expresados en plantas para tratar de "*inmunomodular*" la infección o funciones celulares concretas. Los denominados "*fitoanticuerpos*" (productos de la expresión, transitoria o permanente, de genes de anticuerpos humanos o de ratón, en plantas transgénicas) abren nuevas posibilidades a la patología vegetal. La producción de anticuerpos en plantas permite disminuir su coste y eliminar el uso de animales de laboratorio para la generación de anticuerpos con destino a técnicas de detección y diagnóstico.

La posibilidad de diseñar sondas para hibridación molecular o iniciadores de PCR, realmente específicos de la diana de interés, va aumentando conforme se va disponiendo de mayor información en los bancos de datos. La enorme potencia de los ordenadores actuales y la disponibilidad de excelentes programas informáticos, han facilitado el diseño de sondas e iniciadores y ha permitido una mejora sensible en la especificidad de los mismos. Las técnicas de secuenciación masiva está produciendo la generación de gran cantidad de información sobre el genoma de los agentes patógenos, muy útil para el diseño de nuevas herramientas moleculares.

## Avances en el incremento de la sensibilidad

Para aumentar la sensibilidad de una técnica se puede actuar amplificando la señal final generada por el método de detección utilizado o bien, amplificando el número de dianas presentes en la muestra inicial. Los métodos que amplifican la señal suelen basarse en reacciones químicas o moleculares y normalmente todos hacen uso de amplificación electrónica. La amplificación de las dianas



suele ser más eficaz y puede llevarse a cabo, para virus fitopatógenos, de forma biológica o mediante amplificación molecular previa.

La amplificación biológica consiste en incrementar el número de agentes patógenos o dianas de los mismos mediante inoculación previa (mecánica o por injerto o por herida) en una planta apropiada. Transcurrido un tiempo de cultivo de la planta hospedadora, el número de copias del patógeno de interés habrá aumentado y su detección será más fiable. Por sí mismo, el uso de plantas indicadoras todavía es válido ya que demuestra el poder patógeno, permite evaluar la agresividad del agente patógeno y además, es capaz de detectar la presencia de enfermedades de etiología desconocida. No obstante, los métodos biológicos poseen numerosos inconvenientes como son su lentitud, incapacidad de ser utilizados a gran escala y su alto coste.

La amplificación molecular de ácidos nucleicos puede ser realizada de forma isoterma o enzimática. La amplificación enzimática mediante diferentes variantes de PCR y RT-PCR, es la más eficaz y popular. En patología vegetal se han descrito diferentes sistemas, enumerados a continuación en orden de su sensibilidad: PCR o RT-PCR convencional, variantes de Inmuncaptura y impresión o escachado-captura, PCR o RT-PCR semianidada o anidada ("Heminested o nested") en un solo tubo cerrado, PCR o RT-PCR Cooperativa ("Cooperational") y PCR o RT-PCR cuantitativa en tiempo real. La amplificación a tiempo real es la técnica más apropiada para el análisis fiable de virus, viroides y fitoplasmas y ha permitido reducir drásticamente problemas asociados a PCR como los riesgos de contaminación y las frecuentes inhibiciones. PCR o RT-PCR a tiempo real es muy apropiada para análisis de rutina de numerosas muestras. Su alta sensibilidad permite agrupar varias muestras en un solo ensayo y puede alcanzar alta especificidad con adecuados iniciadores y sondas. Se trata de la técnica más conveniente para descartar infecciones y garantizar el correcto estado sanitario de material vegetal en un corto periodo de tiempo (1 a 2 horas) y de forma cuantitativa (Figura 4).

## Conclusiones

En la actualidad la detección y el diagnóstico están marcados por grandes avances en sensibilidad (nuevas técnicas y protocolos integrados) y especificidad (mejora substancial en la calidad de los reactivos), debido al notable incremento del conocimiento a nivel molecular de muchos agentes fitopatógenos. La posibilidad real de secuenciar de forma automática, el desarrollo actual de técnicas de biología molecular, la nanotecnología y la informática, lideran los avances en



**Figura 4. La técnica de amplificación molecular basada en PCR a tiempo real es la más sensible y fiable para la detección de virus, viroides y fitoplasmas de especies leñosas. Su aplicación creciente permitirá mejorar el control de importaciones, incrementar la fiabilidad de pasaportes fitosanitarios y certificados y contribuirá al éxito de la erradicación de patógenos emergentes. Las detecciones y/o diagnósticos se realizan en menos de 2 horas sin necesidad de purificar ácidos nucleicos, constituyendo una técnica de referencia para análisis rápidos en frontera, laboratorios de alerta biológica y control y certificación sanitaria.**

sistemas y protocolos de detección y diagnóstico. Paralelamente al desarrollo de nuevos y mejores reactivos y métodos, han ido surgiendo empresas que ofrecen comercialmente estuches de diagnóstico, kits o servicios. Se han estandarizado protocolos de diagnóstico y detección a nivel internacional y se han validado métodos y reactivos. Se han creado laboratorios muy especializados que actúan como centros de referencia nacional e internacional y redes de laboratorios destinadas a la prevención de la introducción de nuevos patógenos y vectores.

La disponibilidad de información muy actualizada y de protocolos y reactivos serológicos y moleculares validados, permiten asegurar una correcta prevención de la dispersión de enfermedades emergentes en los países más desarrollados. La rapidez en el diagnóstico y la fiabilidad de las detecciones, son las características de la actual aplicación de pruebas o ensayos moleculares de alta sensibilidad y precisión.

Las nuevas versiones de las técnicas de detección y diagnóstico están contribuyendo de una forma definitiva al control de enfermedades emergentes y de sus vectores, a su erradicación, a la lucha contra intentos de entradas intencionadas o clandestinas, en estaciones de cuarentena, y en cualquier caso, a la toma de decisiones relativas a su manejo.

## BIBLIOGRAFÍA ASOCIADA

- CAMBRA, M., BERTOLINI, E., OLMOS, A., CAPOTE, N. (2006). *Molecular methods for detection and quantitation of virus in aphids*. 81-88. In: Virus Diseases and Crop Biosecurity. Ed. I. Cooper, T. Kuehne and V. Polischuk. NATO Security through Science. Series C: Environmental Security. Springer. 148 pp.
- CAPOTE, N., BERTOLINI, E., OLMOS, A., VIDAL, E., MARTÍNEZ, M.C., CAMBRA, M. 2009. *Direct sample preparation methods for detection of Plum pox virus by real-time RT-PCR. Validation and practice parameters*. International Microbiology 12, 1-6.
- LÓPEZ, M.M., BERTOLINI, E., MARCO-NOALES, E., LLOP, P., CAMBRA, M. (2006). *Update on molecular tools for detection of plant pathogenic bacteria and viruses*. 1-46. In: Molecular Diagnosis. Current Technology and Applications. Ed. J. R. Rao, C.C. Fleming and J. E. Moore. Horizon Scientific Press. Hethersett, UK.
- LÓPEZ, M., LLOP, P., OLMOS, A., MARCO-NOALES, E., CAMBRA, M., BERTOLINI, E. 2009. *Are Molecular Tools Solving the Challenges Posed by Detection of Plant Pathogenic Bacteria and Viruses?* Current Issues in Molecular Biology 11, 13-46.
- OLMOS, A., BERTOLINI, E., CAPOTE, N., CAMBRA, M. (2007). *Molecular diagnostic methods for plant viruses*. 227-249. In: Biotechnology and plant disease management. Punja, Z.K., De Boer, S.K., Sanjaon, H. CABI Press. British Columbia.